

Aus dem Medizinischen Institut für Lufthygiene
und Silikoseforschung

an der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. H.-W. Schlipköter)

Methodische Untersuchungen zur automatischen Morphometrie
von Lungenstrukturen mit Hilfe des Digiscan Phasenintegrators

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jürgen K l i n k e n

1978

1979

Aus dem Medizinischen Institut für Lufthygiene
und Silikoseforschung

an der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. H.-W. Schlipköter)

Methodische Untersuchungen zur automatischen Morphometrie
von Lungenstrukturen mit Hilfe des Digiscan Phasenintegrators



Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jürgen K l i n k e n

1978

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.: Prof. Dr. med. Reinauer

Referent
gez.: Priv.-Doz. Dr. Bruch

Koreferent
gez.: Prof. Dr. Müntefering



Inhaltsverzeichnis	Seite
Einleitung	1
Methodik	
Gerät und Prinzip der Meßwerterfassung	5
Tierexperimente	6
Ergebnisse	
Probleme der automatischen Analyse von Lungen	7
Densitometrische Messungen des Lungen- gewebes	9
Ergebnisse der Morphometrie der Papainlungen	14
Diskussion	16
Zusammenfassung	19
Literatur	21

Einleitung

Stereologische Methoden haben in jüngerer Vergangenheit zunehmend Eingang in die wissenschaftlichen Untersuchungen von Gewebsschnitten gewonnen. Es handelt sich hierbei um Verfahren, die aus der Morphologie der zweidimensionalen Fläche Informationen über den Aufbau des dreidimensionalen Raumes gewinnen. Schnitte können als zweidimensionale Stichproben des Gewebes betrachtet werden, deren morphometrische Auswertung qualitative und quantitative Daten über das Gefüge der Gewebskomponenten im Organ ergibt. Die von dem Franzosen Delesse (4) 1847 entwickelte fundamentale Beziehung der Stereologie besagt, daß die Volumenfraktion V_{vi} einer Komponente im Gewebe durch die Messung der Flächenfraktion A_{AI} ermittelt werden kann:

$$V_{vi} = A_{AI}$$

Entsprechend dieser Grundgleichung reduziert sich im Schnitt die Dimension des Raumes um die Zahl $n - 1$:

Volumen	———	Fläche
Oberfläche	———	Linie
Linie	———	Punkt

Mit Hilfe der Morphometrie der Gewebsschnitte kann in einfacher Weise eine Volumenanalyse, eine Bestimmung der Oberfläche und anderer Gefügedaten vorgenommen werden. Eine

weitere Grundgleichung sagt aus, daß die Volumenfraktion einer Struktur am Gesamtvolumen der Flächenfraktion an der Gesamtfläche, der Linienfraktion an der Gesamtlinie, sowie der Punktfraktion an der Gesamtpunktzahl im histologischen Schnitt entspricht.

$$V_{vi} = A_{AI} = L_{Li} = P_{Pi}$$

In der praktischen Morphometrie sind alle drei Verfahren in Gebrauch: Planimetrie, Linearanalyse und Punktzählverfahren. Die Handauswertung von Schnitten bedient sich insbesondere des Punktzählverfahrens; für die Linearanalyse können sowohl semiautomatisch arbeitende Geräte (Leitz ASM, MOP AMo3 Kontron) als auch automatische Geräte (Digiscan Phasenintegrator, Kontron) eingesetzt werden. Die Flächenanalyse wird im wesentlichen in Verbindung mit TV Automaten benützt (z.B. Quantimet 720 Cambridge Instr., TAS und Classimat, Leitz, u.a.). Prinzipielle Vorteile und Schwächen der einzelnen Verfahren sind ausführlich dargestellt (10), doch läßt sich aufgrund der sehr dynamischen Entwicklung der morphometrischen Analyse Endgültiges noch nicht aussagen.

Intention der vorliegenden Untersuchung ist es, die Möglichkeiten der Morphometrie von Lungenstrukturen mit Hilfe eines nach dem Prinzip der Linearanalyse arbeitenden, automatischen Instrumentes zu prüfen.

Methodik

Gerät und Prinzip der Meßwerterfassung

Bei dem für die automatisch-morphometrische Untersuchung eingesetzten Gerät handelt es sich um ein Scanning Mikrophotometer, dem Digiscan-Phasenintegrator der Firma Kontron. Das technische Prinzip basiert auf ein von FISCHMEISTER (5) nach dem Verfahren des specimen plain scanning (SPS) entwickelten Instrument. Lichtquelle und optischer Halbleiterdetektor sind in der optischen Achse eines Lichtmikroskopes fest installiert, während das Präparat in der x- und y-Richtung senkrecht zu dieser Achse bewegt und nach dem stereologischen Prinzip der Linearanalyse abgetastet wird. Verschiedene Präparatstrukturen im histologischen Schnitt zeichnen sich durch eine bestimmte optische Dichte aus, die durch den Detektor in eine entsprechende elektrische Spannung umgesetzt wird. Neben dem Detektor-Signal werden während der Messung Wegimpulse vom Präparattisch mit Hilfe spezieller Decoderscheiben, die unmittelbar am Tisch angebracht sind, abgenommen. Das vom Halbleiterdetektor ankommende Signal wird in Diskriminatoren eingegeben, die dann die Wegimpulse von den optischen Decodern des Präparattisches auf die Zählwerke für die entsprechenden Phasen aufteilen. Jeder Diskriminator arbeitet nach dem Prinzip der Ja-Nein-Funktion. Am Diskriminator kann mit Hilfe einer oberen und einer unteren Schwelle eine Gewebsstruktur anhand ihres charakteristischen Signalniveaus "erkannt" werden und mit den dazugehörigen Wegimpulsen angekuppelt werden. Am

Beispiel der Lunge lässt sich z.B. der Alveolarraum durch ein bestimmtes Spannungsniveau gegenüber dem Gewebe, den Alveolarsepten, Bronchien etc. trennen (Abb. 1). Die Weglängen einer bestimmten Phase werden im Phasenintegrator kumuliert und können mit der Gesamtweglänge, der Größe des Präparates oder mit den Weglängen anderer Phasen verglichen werden. Tritt während der Messung ein Wechsel der vom Diskriminator erkannten Phase auf, wird jeweils in einem eigenen Zähler für die entsprechende Phase ein Schnittpunkt registriert. In der für diese Untersuchung zur Verfügung stehenden Ausrüstung können mit Hilfe von vier Diskriminatoren vier verschiedene Phasen und die dazugehörigen Schnittpunkte im Phasenintegrator jeweils getrennt registriert werden. Zusätzlich wird in der Funktionseinheit des Gruppendiskriminators eine Aufteilung der Phasenlängen (= Sehnenlängen) nach Größenklassen vorgenommen. Die Sehnenlängen werden als lineare Größenklassen oder mit geometrisch gestufter Klassenteilung (Modul $\sqrt{2}$) gruppiert. Die Auftragung kann wählbar integral als Summenhäufigkeit oder differential als Histogramm der Sehnenlänge eingestellt werden. Die Definition des Meßfeldes erfolgt am digital gesteuerten Präparattisch, wobei entweder ein festes xy-Feld vorgegeben wird oder aber die Größe des zu messenden Areals mit Hilfe einer x- und y-Umfahrung einprogrammiert wird. Die Messung selbst läuft mäanderförmig ab, wobei die Größe der y-Schritte im weiten Bereich einstellbar ist. Die Genauigkeit der Messung beträgt 0,5 µ Weglänge pro Impuls und erreicht somit die theoretische Auflösungsgrenze des Lichtmikroskopes.

Das morphometrische Analysengerät wurde über ein Interface an die im Hause bestehende Datenanlage PDP 10 angeschlossen. Nach

Beendigung der jeweiligen Messung erfolgte der Datentransfer auf die Platte des Computersystems; gleichzeitig wurden die Ergebnisse über ein interaktives Fernsehterminal auf einem Bildschirm sichtbar gemacht, wobei neben den Primärdaten der Phasenmengen und Schnittpunkte sowie der Sehnenlängenverteilung des Gruppendiskriminators bereits eine Errechnung der Sekundärparameter erfolgte. Folgende Gefügemerkmale wurden berechnet:

1. Volumenfraktion

$$V_i = Li/L \quad (1)$$

(L = Gesamtimpulszahl entlang der Meßstrecke;

Li = Impulszahl für den Bestandteil i).

2. Oberflächendichte

Diese Größe wird als volumenbezogene Grenzfläche S_i bezeichnet und ist definiert durch

$$S_i = 4 Ni/L \quad (\text{cm}^2/\text{cm}^3) \quad (2)$$

(Ni = Schnittpunktzahl, Zahl der von der Meßlinie geschnittenen Bestandteile der Phase i).

3. Die mittlere Sehnenlänge (MLI, mean linear intercept)

läßt sich nach der Formel

$$\bar{x} = Li/Ni \quad (3)$$

berechnen.

Neben diesen konventionellen Parametern zur morphometrischen Beschreibung von Lungenveränderungen, die z.B. quantitativ ein Emphysem über die innere Lungenoberfläche (=Oberflächendichte) definieren können, wurden in der vorliegenden Unter-

suchung weitere Parameter zur Quantifizierung der Gewebsveränderungen aus dem im Gruppendiskriminator aufgezeichneten Histogramm der Sehnenlängen abgeleitet. Wie bereits frühere Untersuchungen ergeben haben (2) sind die Sehnenlängen über den Septen und den Alveolen von Lungenparenchym annähernd logarithmisch normal verteilt (Abb. 2). Der Median des Histogramms gibt die Klassengröße der log-normalen Sehnenlängenverteilung an, die die Sehnenlängen in zwei Hälften teilt. Wesentlich ist, daß dieser Wert im Gegensatz zum arithmetischen Mittel der Sehnenlängen (MLi) von Extremwerten relativ unbeeinflusst blieb. Solche Extremwerte traten bei der automatischen Messung vor allem im Bereich der kleinen Sehnenlängen auf; sie werden z.B. durch Mikroporositäten in den Alveolarsepten verursacht.

Die 9. Dezile definiert jene Klassengröße, oberhalb der noch 10% der Sehnenlängen gelegen sind. Dieser Wert beschreibt das gehäufte Auftreten größerer Sehnenlängen durch lokale Gewebsveränderungen, wie z.B. Emphysemlasen.

Tierexperimente

Die methodischen Untersuchungen wurden an lichtmikroskopischen Schnitten von zwei Tierversuchen vorgenommen. Bei der ersten Tiergruppe handelte es sich um Meerschweinchen, die in einem Langzeitversuch Asbeststaub inhalierten und deren Lungen in Abhängigkeit von der Expositionsdauer ein unterschiedlich starkes Emphysem entwickelten. Methodik und Ergebnisse dieser Untersuchungen werden an anderer Stelle ausführlich veröffent-

licht (3); in diesem Zusammenhang interessiert lediglich, daß aufgrund von Versuchsbedingungen unterschiedliches Gewebsmaterial zur methodischen Prüfung der morphometrischen Analyse zur Verfügung stand. Es wurden 4 verschiedene Areale (A - D) ausgewählt; Areal A wies deutliche Vergrößerungen der Alveolen im Vergleich zum Kontrollareal D auf; die Areale B und C ließen sich zwischen die beiden Extremen einordnen. Eine zweite Versuchsreihe erfolgte an Lungen von Mäusen, denen intratracheal 5 mg Papain instilliert wurde; unbehandelte Tiere dienten als Kontrolle. Vier Tage nach der Instillation des Enzyms wurden die Tiere durch eine tiefe Nembutal-Narkose ruhig gestellt, der Thorax über eine breite vordere Thorakotomie eröffnet und die Lungen mit Hilfe einer Instillationsfixierung mit Glutaraldehyd unter einem Druck von 9 cm Wasser fixiert. Die methodische Untersuchung dieser zweiten Versuchsreihe erfolgte ebenfalls an mit HE gefärbten Paraffinschnitten der Lungen.

Ergebnisse

Probleme der automatischen Analyse von Lungen

Die automatische Detektierung von Strukturen anhand phasentypischer Helligkeiten bereitet in der metallurgischen Auflichtmikroskopie relativ geringe Schwierigkeiten. Auch die Vermessung von Lungenschnitten scheint im Vergleich zu normalen histologischen Präparaten einfach zu sein, da sich die hellen Alveolen von den gefärbten Gewebsstrukturen stark unterscheiden (Abb. 3). In der praktischen Durchführung ergaben sich dennoch Schwierigkeiten, die vor allem aus der unterschiedlichen Dichtigkeit der Phase "Septen" resultierten (Abb. 3 c). Eine analoge Schreibung der Helligkeiten des Gewebes zeigte (Abb. 1), daß die Dynamik (Spannbreite) der

Dichtewerte des Gewebes sehr groß war, so daß die hellsten Stellen (z.B. Gefäßlumina mit Serumdichte) bereits sehr nah an die Werte der Phase "Alveolarlumen" heranreichten. Normalerweise geht man für die Schwellwerteinstellung der Diskriminatoren zur Abgrenzung der Phasen untereinander von der mittleren Dichte der jeweiligen Phase aus und legt für die Messung die Schwelle als 50%-Schwellwert exakt zwischen beide Phasen (Abb. 1). Grundsätzlich ist ein solches Vorgehen wünschenswert, da nur unter dieser Bedingung ein Randfehler durch die endliche Größe des Meßfleckes vermieden werden kann. Die Anwendung dieses Prinzips auf die vorliegenden Gewebsstrukturen würde bedeuten, daß die mittlere Dichte wegen der großen Spannbreite der Helligkeitsunterschiede im Septumgewebe eine 50%-Schwellwerteinstellung errechnen läßt, die die hellsten Stellen des Septumsgewebes nicht mehr zur Phase "Septum" messen würde (vgl. Erläuterung in Abb. 1). Wie die Abbildung verdeutlicht, würden unter einer solchen Meßbedingung zu viele Schnittpunkte gezählt werden. Die später noch genau zu beschreibende methodische Untersuchung anhand systematischer Veränderungen der Schwellwerte kann dieses noch genauer verdeutlichen. Prinzipiell wurde bereits früher auf dieses Problem eingegangen (2); wir benützten zur Schwellwerteinstellung für die Abgrenzung der Phasen nicht die mittlere Gewebsdichte, sondern einen typischen hellen, reproduzierbar auffindbaren Gewebswert, wie z.B. Gefäßlumen mit Serumhelligkeit (Abb.3c). Es bestanden aber keine Kenntnisse über die möglichen Fehler der Messung bei subjektiver Wahl des Referenzwertes. Sinn der vorliegenden Untersuchung war es, Fehler bei der Wahl des Referenzwertes für die Gewebsdichten anhand systematischer

Grundlagenuntersuchungen abzuschätzen.

In Verbindung mit diesem methodischen Vorgehen sollte weiterhin geprüft werden, inwieweit neu entwickelte morphometrische Parameter, die aus der Sehnenlängenverteilung abgeleitet wurden (Median und 9. Dezile der Sehnenlängenverteilung), beeinflußt werden.

Densitometrische Messungen des Lungengewebes

Ein Versuch, diese Frage experimentell zu lösen, bedeutete die Durchführung einer Serie von Messungen unter systematischer Veränderung der Diskriminationsschwellen in kleinen Schritten; es handelte sich also um eine Art densitometrischer Messung. In der praktischen Durchführung wurden aber nicht bei jedem Durchgang die Schwellen der Diskriminatoren verändert, sondern es wurde das Meßsignalband vom Präparat mit Hilfe der Potentiometerverstellung an der Photodiode auf die feststehende Schwelle des Diskriminators parallel verschoben. Das Ergebnis einer solchen in 10 mV-Schritten vorgenommenen Messung ist in Abb. 4 am Beispiel der Volumendichte des Alveolarraumes dargestellt. Es zeigte sich, daß bei Verstellung des Signalbandes um 10 mV-Stufen ein plötzlicher Anstieg von 10 auf etwa 60% der Volumendichte zu verzeichnen war; bei weiterer Verschiebung konnte eine gleichmäßige Zunahme des Anteils der Alveolen bis auf 100% festgestellt werden. Die entsprechende Aufzeichnung der Volumenanteile des Septalgewebes (Abb. 5) wies: ein spiegelbildliches Verhalten auf. Aus den beiden Diagrammen wird ohne weiteres verständlich, welchen einen großen Einfluß die

Festlegung der Schwelle auf die Anteiligkeiten der verschiedenen Phasen besitzt. Dies ergibt sich vor allem aus der Tatsache der fast gleichförmigen Mengenverteilung der verschiedenen Gewebsdichten. Die Oberflächendichte zeigt bei systematischer Veränderung ein völlig anderes Verhalten (Abb. 6). Auch hier ist beim Erfassen der ersten Strukturen entsprechend dem initialen Anstieg der Volumendichte der Alveolen ein sprunghaftes Auftreten von Schnittpunkten festzustellen; die Zahl der Schnittpunkte nimmt dann im weiteren Verlauf der Verstellung der Schwelle relativ rasch zu, um nach Durchschreitung eines Maximums wieder abzufallen. Dieser Kurvenverlauf der Oberflächendichte erklärt sich durch das Aufbrechen ursprünglich geschlossener Phasenstrukturen während der Schwellwertveränderung, wodurch zusätzliche Schnittpunkte an den neu entstandenen Grenzflächen generiert werden. Beim weiteren Anheben der Schwelle werden zunehmend schwach gefärbte Septen mit ihren Grenzflächen nicht mehr erfaßt, so daß die Schnittpunktzahl nach Erreichung des Maximums kontinuierlich abnehmen muß.

Die im vorherigen Absatz dargelegte Annahme zur Deutung des Verhaltens der Oberflächendichte in Abhängigkeit von der Schwellwerteinstellung kann anhand der Aufzeichnungen der Histogramme der Sehnenlängen weiter präzisiert werden. In den Abbildungen 7 und 8 sind die Verteilungen der Sehnenlängen bei 10- und 40facher Vergrößerung in Abhängigkeit von der Schwelle aufgezeichnet. Um die Darstellung übersichtlicher zu halten, wurde nur jede 3. Registrierung bis zur 22. Messung geplottet. Auf den ersten Blick scheinen die Kurven darauf

hinzuweisen, daß bei einer Verstellung der Schwellwerte über einen relativ großen Bereich der grundsätzliche Charakter des Kurvenverlaufes sich ebensowenig ändert wie die Lage des Häufigkeitsmaximums. Die Kurven der 10- und 40fachen Vergrößerung unterscheiden sich allerdings insofern, als bei der 40fachen Vergrößerung das Histogramm bereits bei den ersten Schwellen eine relativ große Zahl an Sehnenlängen in dem kleinen Größenbereich ermittelt. Weiterhin erkennt man, daß bei Verstellung der Schwelle in diesem Bereich der kleinen Größenklassen relativ große Veränderungen auftreten, während das Häufigkeitsmaximum über der Klasse 9 - 11 relativ unverändert bleibt. Eine Erklärung dieses Phänomens ist in der relativen Größe des Meßkreises in Bezug auf die Gewebsstrukturen in Abhängigkeit von der Vergrößerung zu suchen. Bei der 40fachen Vergrößerung beträgt der Meßkreisdurchmesser nur noch $1,25\mu$ und detektiert somit kleinste Aufhellungen im Bereiche des Septalgewebes, wobei die detektierte Zahl solcher hellen Stellen in Abhängigkeit von der Schwellwerteinstellung relativ rasch zunimmt. Bei 10facher Vergrößerung ist das Meßareal mit 5μ sehr viel größer, was zur Folge hat, daß kleine Mikroporositäten nur in Kombination mit dem benachbarten dunkleren Gewebe im Meßkreis vorliegen und somit als Ereignis nicht registriert werden können (vgl. Abb. 3 c). Es ist klar, daß solche Phänomene in Abhängigkeit von der Vergrößerung und der Schwellwerteinstellung einen direkten Einfluß auf den Parameter "innere Oberfläche" besitzen, da jeder Schnittpunkt unabhängig von der Zuordnung zu einer großen oder kleinen Sehnenlänge völlig wertfrei als Primärdatum für die Oberflächenberechnung eingeht. Wie später noch statistisch

genauer zu belegen sein wird, deutet sich bereits hier an, daß die Oberfläche, besonders bei 4ofacher Vergrößerung, ein sehr unstabiles Merkmal zur Beschreibung von Gewebsstrukturen ist. Für die statistische Analyse der Histogramme wurde aus dem Kurvenverlauf der Median und die 9. Dezile errechnet. Die beiden Diagramme 9 und 10 zeigen das Verhalten des Medians und der 9. Dezile in Abhängigkeit von der Schwellwerteinstellung; der Kurvenverlauf weist gegenüber den bisher vorgestellten Parametern ein deutlich abweichendes Verhalten auf. Nach einem raschen initialen Anstieg kommt es über mehrere Schwellwerteinstellungen zu einem Plateau. Aus dem Verlauf der Kurven deutet sich bereits an, daß die Parameter Median und 9. Dezile im Vergleich zur Volumendichte und Oberflächendichte über einen bestimmten Bereich als relativ stabile Merkmale einer morphometrischen Analyse anzusehen sind.

Nachdem der prinzipielle Verlauf der Kurven für die verschiedenen Parameter getestet war, stellte sich die Frage, inwieweit bei unterschiedlichen Geweben eine quantitative Charakterisierung unter dem im vorherigen Kapitel dargelegten methodischen Vorgehen möglich war. Es wurden vier Lungengewebsareale von Tieren aus dem Asbeststaubversuch ausgewählt, von denen sich zwei sehr deutlich unter dem Merkmal "Normal-lunge - Emphysemlunge" unterschieden und zwei weitere Gewebsbezirke angedeutete Emphysemcharakteristik aufwiesen. Diese vier Areale wurden darüber hinaus unter den gegebenen Kriterien jeweils mit 1ofacher und 4ofacher Vergrößerung getestet; die Meßfläche war gleich groß. Die Ergebnisse sind

in den Abbildungen 11 - 18 dargestellt. Man erkennt, daß sowohl bei 10facher als auch bei 40facher Vergrößerung die Kurvenlage bei einem ähnlichen Verlauf für die beiden extremen Gewebsareale deutlich unterschiedlich ist. Die Parameter der Verteilungsfunktion der Sehnenlängenverteilung (Median und 9. Dezile) zeigen über einen gewissen Bereich einen der X-Achse parallel oder angenähert parallelen Verlauf.

Als nächster Schritt schloss sich eine statistische Prüfung der verschiedenen Parameter im Hinblick auf ihre Trennfunktion für die vier getesteten Gewebsareale an. Es wurde davon ausgegangen, daß bei konventioneller, subjektiver Einstellung der Schwellwerte der Diskriminatoren ein Meßwert gewählt wird, der in dem Anfangsbereich der Meßreihe nach dem initialen Anstieg liegen dürfte; eine Spannbreite von 70 mV sollte in jedem Fall ausreichend den Bereich des subjektiv ausgewählten Schwellwertes abdecken. Für die statistische Bewertung wurden daher aus der Meßreihe der Werte nach dem Anstieg der zweite und die sechs darauffolgenden Werte aussortiert und als Stichprobe mit sieben Elementen mit den entsprechenden Werten der drei anderen Gewebsareale verglichen. Hierbei erfolgte eine Varianzanalyse sowie eine Testung der Mittelwertsunterschiede im Scheffe-Test. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 dargestellt. Hierbei wird erkennbar, daß die F-Werte der Gesamtvarianz aller Parameter für die 40fache Vergrößerung deutlich höher liegen als für die 10fache Vergrößerung; eine Ausnahme bildet die Oberflächendichte, deren Gesamtvarianz für die 10fache Vergrößerung deutlich sichere Werte anzeigt (10,1 gegen 5,5). Beim Vergleich der Parameter untereinander ergibt sich, daß

die Trennfunktion für die verschiedenen Gewebsareale über dem Median und auch über der 9. Dezile der Sehnenlängenverteilung am schärfsten ist. Deutlich kommt die relativ große Diskriminationsfähigkeit des Medians beim Vergleich der ähnlichen Gewebsareale A und B mit einem F-Wert von 6,53 ($p = 0,1$) zutage. Von Interesse ist, daß bei Gegenüberstellung der Areale A gegen C die 9. Dezile mit einem F-Wert 10,59 bei 4ofacher Vergrößerung bzw. 5,8 bei 1ofacher Vergrößerung gegenüber dem Median deutlich sicherer diskriminiert. Hieraus kann geschlossen werden, daß die beiden Areale sich im wesentlichen in der rechten Seite der Verteilung der Sehnenlängen unterscheiden.

Zusammenfassend kann geschlossen werden, daß die Parameter der Sehnenlängenverteilung unter Simulation der subjektiven Einstellungsungenauigkeit bei systematischer Verstellung der 50%-Schwelle hinsichtlich der Alveolengröße verschiedene Gewebsareale deutlich besser trennen, als die konventionellen Parameter Volumendichte und Oberflächendichte.

Ergebnisse der Morphometrie der Papainlungen

In einer zweiten Versuchsserie wurde auf der Basis der erarbeiteten, oben dargelegten Grundlagen die Vermessung von durch Papain erzeugten Emphysemlungen vorgenommen und gegen unbehandelte Kontrollungen verglichen. Der Schwerpunkt dieser Untersuchung lag hierbei auf der praxisnahen Anwendung und auf dem Vergleich der Diskriminanzfunktion der oben getesteten Parameter unter realen Versuchsbedingungen. Aus diesem Grunde

wurde bei der Schwellwerteinstellung der Diskriminatoren nur eine relativ geringe Sorgfalt verwandt. Hauptziel war es, die durch die Präparate selbst gegebene Varianz bei gleichzeitiger Inkaufnahme einer relativ ungenauen Messung zu prüfen. Es lagen insgesamt 4 Kontrolltiere und 4 Emphysem-tiere vor. Von den linken Lungenlappen eines jeden Tieres wurden 4 - 5 in unterschiedlicher Tiefe gewonnene Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen und in der üblichen Weise mit HE gefärbt. Die Messung erfolgte an der gesamten Fläche des Schnittes bei 10facher Vergrößerung; der y-Abstand betrug 50 μ .

Für den statistischen Vergleich wurden die verschiedenen Schnitte eines Tieres zu jeweils einer Stichprobe zusammengefaßt und die Tiere in der Varianzanalyse und im Scheffe-Test miteinander verglichen. Die Mittelwerte für die verschiedenen Parameter pro Tier in der Reihenfolge der Größe sind in Tab. 2 aufgezeichnet. Die Bewertung der Ergebnisse im Einzelvergleich unter Angabe der Prüfgröße F des Scheffe-Testes findet sich in Tab. 3. Es läßt sich erkennen, daß der F-Wert für die 5. Dezile mit 100,14 mit Abstand am höchsten ist gegenüber der Oberflächendichte und der 9. Dezile mit 39,8 bzw. 31,3 und der Volumenfraktion mit 20,6. Die Werte des Einzelvergleiches eines jeden Tieres miteinander ergeben Mittelwertsunterschiede aller morphometrischen Parameter im Sinne der Hypothese. Betrachtet man nun die einzelnen Prüfgrößen F aller Versuchstiere gegenüber den 4 Kontrolltieren unter dem Aspekt der Diskriminanzfunktion der verschiedenen Parameter, so erkennt man, daß der Median, der Mittelwert der Sehnenlängenverteilung und die 9. Dezile sowie die Oberflächendichte

aller Lungen gegenüber den Kontrollungen bis auf das Tier Nr. 7 sicher unterscheidet. Das Tier Nr. 7 scheint eine besondere Veränderung der Lungenstruktur aufzuweisen, da der Median, der Mittelwert und die Oberflächendichte gegenüber allen Kontrollen statistisch nicht zu unterscheiden ist. Womhingegen die 9. Dezile eine deutliche Rechtsverschiebung im Sinne eines Emphysems aufzuweisen scheint. Dieser Befund ist statistisch gesichert. Das hier Dargelegte wird am Beispiel der integrierten Histogramme jeweils charakteristischer Gruppen verdeutlicht. In der Abbildung 19 ist eine Normal-lunge mit einem extremen Emphysem verglichen; in der Abbildung 20 steht der Normallunge ein Organ mit angedeutetem Emphysem gegenüber. In dem letzten Fall erkennt man eine leichte Veränderung der Histogrammkurve zur rechten Seite der größeren Sehnenlängensklassen hin. Offenbar kann die Bewertung der Lungen über das Histogramm der Sehnenlängen und hier insbesondere über die Bewertung der rechten Seite der Verteilung ein isoliertes Auftreten größerer Sehnenlängen bei sonst normaler Lungenstruktur nachweisen. Dies spricht für das Auftreten einzelner größerer Alveolen bei sonst anscheinend unveränderter Alveolenpopulation.

Diskussion

Die methodischen Untersuchungen zur Brauchbarkeit eines automatischen morphometrischen Analysegerätes zur quantitativen Beschreibung emphysematischer Lungenveränderungen wurde an zwei differenten methodischen Ansätzen geprüft. Im ersten

Abschnitt sollte die Eignung einiger stereologischer Parameter unter systematischer Veränderung der für die "Kennung" der Gewebsstrukturen entscheidenden Schwellwertsetzung der Diskriminatoren getestet werden. Hierbei wurden herkömmliche Parameter wie die Volumendichte und die Oberflächendichte von Gewebsstrukturen benutzt. Aus dem Histogramm der im Gruppendifskriminator registrierten Sehnenlängen ließen sich als zusätzliche Meßgrößen der Median und die 9. Dezile der Verteilung ableiten. Die statistische Analyse aller Parameter im Hinblick auf die Stabilität der Meßergebnisse bei Testung an vier verschiedenen Gewebsstrukturen ergab, daß die neu entwickelten Parameter die unterschiedlichen Lungenstrukturen deutlich trennschärfer aufgliedert als eine Vermessung der Volumendichte und der Oberflächendichte. Hierbei erwies sich die 4ofache gegenüber der 1ofachen Vergrößerung als günstiger, da die statistischen Meßgrößen in der Regel beträchtlich höher lagen. Lediglich bei dem Parameter Oberflächendichte konnten mit der schwächeren Vergrößerung bessere Ergebnisse erzielt werden; wie die geplotteten Histogrammkurven bei verschiedenen Werten der Schwelleneinstellung zeigen, traten im Bereich der kleinen Klassen zusätzliche, sehr stark von der Einstellung der Schwelle abhängige Sehnenlängen auf, die dieses Phänomen sicher erklären. Hiermit konnten die Ergebnisse früherer Untersuchungen, in denen erstmals die Meßgrößen Median und 9. Dezile der Sehnenlängenverteilung als brauchbarer Parameter zur Vermessung des Emphysems vorgestellt wurden, bestätigt werden

(2).

In der zweiten Versuchsserie wurden durch Papain erzeugte Emphysemungen mit Kontraktionen bei 10facher Vergrößerung verglichen. Die Ergebnisse liegen grundsätzlich auf der Ebene der ersten Versuchsserie. Weiterführende Untersuchungen werden in Zukunft zeigen, ob auch bei solchen Messungen durch Wahl einer anderen Vergrößerung eine weitere Verbesserung der Trennschärfe erreicht werden kann. Von besonderem Interesse ist, daß neben einer rein quantitativen Beschreibung durch die aus dem Histogramm der Sehnenlängen abgeleiteten Parameter auch eine qualitativ morphometrische Differenzierung verschiedener Lungenstrukturen möglich scheint. So sprechen die Befunde dafür, daß der Median besonders eine allgemeine Ausweitung der Alveolengröße (panlobuläres Emphysem) beschreibt, während die 9. Dezile der Sehnenlängenverteilung durch das Auftreten einzelner größerer Luftbereiche (zentrilobuläres Emphysem) beeinflusst wird.

Die quasi-densitometrische Meßreihe gibt darüber hinaus einen guten Eindruck von dem Verhalten der Parameter bei unterschiedlichen Schwellwertsetzungen. Von Interesse ist auch, daß alle Meßgrößen initial einen steilen Anstieg zeigen. Weitergehende Überlegungen lassen es denkbar erscheinen, diesen primären Anstieg als rechenbare Meßmarke für eine automatisierte Schwellwertsetzung zu benutzen. Heute zur Verfügung stehende Mikroprozessoren sind nach überschlägiger Rechnung in der Lage, die Werte einer Meßlinie analog zu speichern und hieraus z.B. über das Kriterium "steiler Anstieg" eine reproduzierbare und vergleichbare Schwelle zu rechnen und automatisch am Gerät anzusteuern.

Morphometrische Untersuchungen sind in der Lage, objektiv Veränderungen der Lungenparenchymtextur zu quantifizieren. Für verschiedene inhalative Noxen, wie NO_2 und O_3 sind emphysematische Wirkungen bekannt und teilweise auch morphometrisch nachgewiesen worden (1, 2, 6, 7, 8). Die Verfeinerung der diagnostischen Möglichkeit der histometrischen Beschreibung scheint für die Zukunft einen wertvollen Beitrag für Untersuchungen von Dosis-Wirkungsbeziehungen im Zusammenhang mit lufthygienischen Fragestellungen zu liefern.

Zusammenfassung

Probleme der automatischen Histometrie von Gewebsbestandteilen mit Hilfe des Digiscan Phasenintegrators ergeben sich vor allem in der unsicheren färberischen Abgrenzung der zu detektierenden Strukturen. Dabei kommt der Schwellwerteinstellung der die analogen Signale in digitale Werte umsetzenden elektronischen Einheit eine wesentliche Bedeutung zu. Die digitalisierten Werte liefern als Primärdaten die Basis für die zu errechnenden sogenannten Sekundärdaten, die morphologischen Parameter. In der Morphometrie von Lungen sind vor allem die Parameter Volumendichte Alveolen am Gesamtlungengewebe und die Oberflächendichte (=spezifische innere Lungenoberfläche) im Gebrauch.

In der vorliegenden Untersuchung wurde im ersten Abschnitt der Einfluß der Schwellwertsetzung der Diskriminatoren auf

diese konventionellen Parameter systematisch untersucht; weiterhin wurden aus der Verteilung der Sehnenlängen über den Alveolen neue Parameter abgeleitet (der Median und die 9. Dezile der Verteilung) und ebenfalls hinsichtlich des Einflusses der Schwellwertsetzung überprüft.

Im zweiten Teil der Studie erfolgte eine Testung aller Parameter bei der quantitativen Messung von Normal- und Emphysemungen. Hierbei lag die Intention vor allem in der Untersuchung der Trennschärfe der Parameter bei einer realistischen von der präparativen Seite her gegebenen Variabilität.

Folgende Ergebnisse ließen sich erzielen:

1. mit dem Digiscan Phasenintegrator kann eine quantitative Ermittlung des Ausmaßes emphysematischer Veränderungen über die Oberflächendichte und über den Interdezilbereich der Sehnenlängenverteilung vorgenommen werden.
2. Die quantitativen Angaben des Interdezilbereichs erweisen sich im Vergleich zu den konventionellen Parametern als deutlich unempfindlicher gegenüber einer ungenauen Schwellwertsetzung am Digiscan-Phasenintegrator. Die 4fache Vergrößerung scheint gegenüber der 1fachen Vergrößerung bessere Werte zu ergeben.
3. Der Median und die 9. Dezile gliedern die Versuchsgruppen "Normallunge vs Emphysemunge" trennschärfer auf.

Literatur

1. Blair, W., M.C.Henry, and R. Ehrlich: Chronic toxicity of nitrogen dioxide. II. Effect on histopathology of lung tissue.
Arch.environm.Hlth, 18 (1969), 186-192.
2. Bruch, J.: Quantitative Analyse der Lungenveränderungen nach Inhalation von partikel- und gasförmigen Schadstoffen mit Hilfe des Digiscan-Phasen-Integrators.
In: Quantitative Analysis of Microsturctures in Medicine. Biology and Materials Development (Ed. H.E.Exner).- Stuttgart: Riederer 1975. S. 187-191.
3. Bruch, J. und P.F.Holt: Elektronenmikroskopische und morphometrische Untersuchungen nach Inhalation von Asbestfasern. In Vorbereitung.
4. Delesse, M.A.: Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches.
C.R.Acad.Sci.(Paris), 25 (1847), 544.
5. Fischmeister, H.: Verfahren und Apparate zur quantitativen Metallographie.
Z.prakt.Metallographie, 2 (1965), 251-260.
6. Freeman, G., S.C.Crane, R.J.Stephens, and N.J.Furiosi: Environmental factors in emphysema and a model system with NO₂.
Yale J.Biol.Med., 40 (1968), 566-570.
7. Freeman, G., S.C.Crane, N.J.Furiosi, R.J.Stephens, M.J.Evans, and W.D.Moore: Covert reduction in ventilary surface in rats during prolonged exposure to subacute nitrogen dioxide.
Am.Rev.Resp.Disease, 106 (1972), 563-579.

8. Freeman, G., G.B.Haydon: Emphysema after low-level exposure to NO₂.
Arch.environm.Hlth, 8 (1964), 125-128.
9. Freeman, G., L.T.Juhas, N.J.Furiosi, R.Mussenden, R.J. Stephens, M.J.Evans: Pathology of pulmonary disease from exposure to interdependent ambient gases (nitrogen dioxide and ozone).
Arch.environm.Hlth, 29 (1974), 203-210.
10. Weibel, E.R., C. Fisher, J.Gahm, A.Schaefer: Current capabilities and limitations of available stereological techniques.
J.Microscopy, 95 (1972), 367-392.

10 x	F	B - C	A - C	A - B	A - D	C - D	B - D
Vol. Alv.	7,7	3,05 x	-	3,3 x	4,5 x	4,2 x	-
Surf. Dens.	10,1	3,20 x	4,1 x	-	-	-	-
Med. Alv.	21,2	12,0 xxx	3,2 x	2,9	5,9 x	17,8 xxx	-
9. Dec. Alv.	20,8	5,19 xx	5,8 xx	4,5 x	- x	20,8 xxx	5,2 x

40 x							
Vol. Alv.	14,5	4,97 xx	-	-	7,3 x	12,4 xxx	-
Surf. Dens.	5,5	-	-	-	5,5 x	-	-
Med. Alv.	62,4	18,79 xxx	3,16 x	6,53 xx	31,7 xxx	36,9 xxx	9,5 xxx
9. Dec. Alv.	39,7	7,03 xx	10,59 xxx	-	9,09xxx	39,3 xxx	13,1 xxx

Tab. 1: Ergebnisse der Morphometrie von 4 verschiedenen Lungenarealen (A,B,C und D) bei 10 und 40facher Vergrößerung. Von jedem der Areale wurden 7 Messungen mit systematisch abgestufter Schwellen vorgenommen. Angegeben sind die F Werte der Varianzanalyse für jeden Parameter sowie die Prüfgrößen T des paarweisen Vergleiches im Scheffetest.

x Interirrtumswahrscheinlichkeit 5%

xx " 1,0%

xxx " 0,1%

Vol. Frakt.		Oberfl. dichte		Median		9. Dez.	
Luft				Luft		Luft	
Tier Nr.	$\bar{x}$	Tier Nr.	$\bar{x}$	Tier Nr.	$\bar{x}$	Tier Nr.	$\bar{x}$
5	568	4	485 cm ² /cm ³	3	39 μ m	4	103 μ m
1	58	3	474	4	41	3	111
8	58	1	465	1	43	1	120
3	59	2	449	2	46	2	126
7	60	7	441	7	46	5	151
2	60	8	384	8	51	8	154
4	63	5	307	5	61	7	180
6	78	6	246	6	125	6	304

Tab. 2: Morphometrische Ergebnisse der Untersuchungen von unbehandelten Mäuselungen (Tier Nr. 1-4) und von durch Papain erzeugten Emphysemungen (Tier Nr. 5 - 8). Die Reihung der Mittelwerte erfolgte nach ihrer Größe. Die Volumentraktion Luft am Gesamtgewebe ergibt keine Differenzierung der Gruppen.

tichprobe VS	Stichprobe	Oberfl.Dichte	Median Luft	9.Dec. Luft
1	5	8,25 +++	3,97 ++	3,62 +
	6	12,5	17,6	16,2
	7	0,66	0,97	3,72 +
	8	3,5 +	2,26	2,96 +
2	5	8,64 +++	3,11 +	1,29
	6	13,65 +++	16,22 +++	8,66 +++
	7	0,05	0,33	2,72 +
	8	3,27	1,18	1,39
3	5	8,87 +++	6,29 +++	4,49 ++
	6	13,4 +++	23,9 +++	19,0 +++
	7	1,05	2,2	4,07 ++
	8	3,97 ++	5,98 ++	3,75 ++
4	5	9,80 +++	5,64 +++	7,45 +++
	6	14,59 +++	22,81 +++	22,68 +++
	7	1,58	1,72	4,82 ++
	8	4,56 ++	4,69 ++	5,57 +++
-Wert der Varianzanalyse:		39,8	101,6	31,3

Tab. 3: Statistik der Ergebnisse aus Tab. 2; angegeben sind die F-Werte der Varianzanalyse sowie die Prüfgrößen T des paarweisen Vergleiches im Scheffetest. Das Tier Nr. 7 aus der Emphysemgruppe unterscheidet sich lediglich über die 9.Dezile der Sehnenlängenverteilung Luft von den Kontrolltieren.

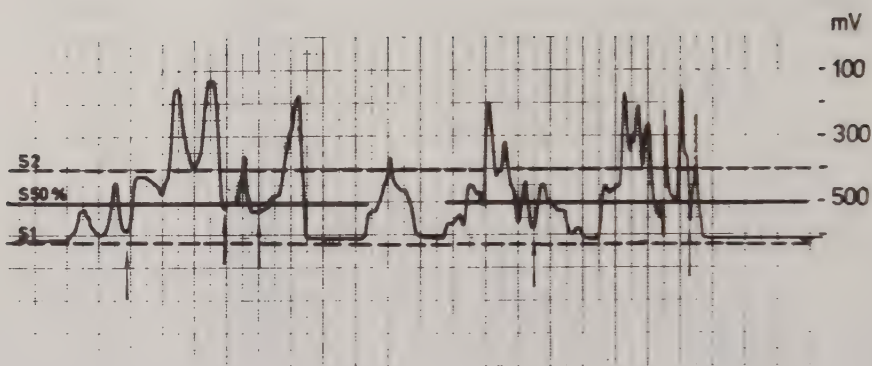


Abb. 1: Analoge Registrierung eines Testlaufes im Lungenparenchym bei 4ofacher Vergrößerung (vgl. Abb. 3 c). S 1 mittlere Helligkeit des Gewebes, S 2 Helligkeit der Alveolarlumina, S 50% = 50%-Idealschwelle für die Diskriminierung von Gewebe und Alveolen. Pfeile markieren einige der fälschlicherweise hierbei registrierten zusätzlichen Schnittpunkte. Eine bessere Messung würde durch Einstellung der Schwelle bei etwa 580 mV erreicht werden.

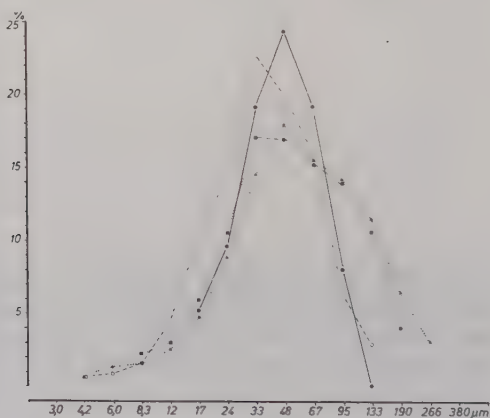


Abb. 2: Annähernd log-Normalverteilung der Sehnenlängen über den Alveolen bei Lungen aus unterschiedlichen Versuchen.

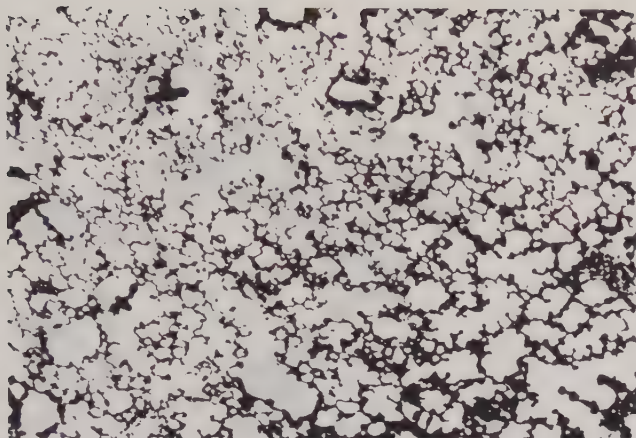


Abb.3a: Unbehandelte Kontrollung der Maus. Vergr. 10 x

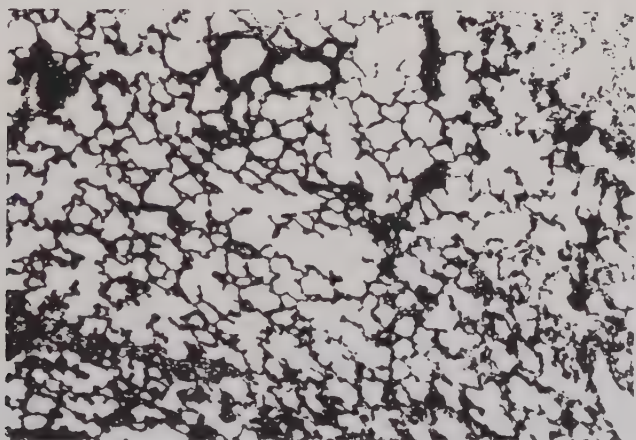


Abb.3b: Emphysemlunge nach Instillation von Papain.
Vergr. 10 x.

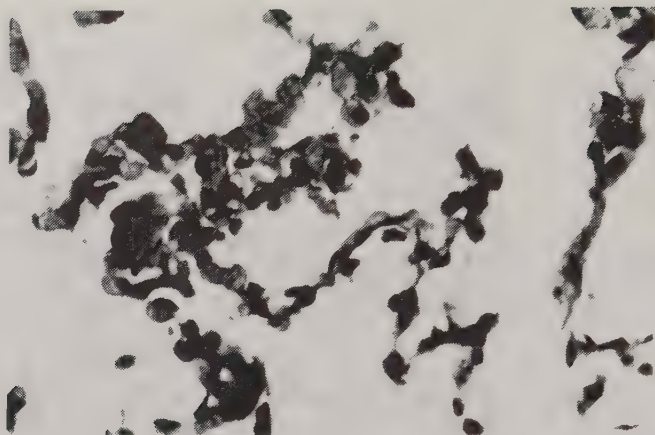


Abb.3c: Lungenparenchym der Maus bei 40facher Vergrößerung; große Spannbreite der Gewebsdichten. Ein Meßfleck mit einem Durchmesser von ca. 1 mm detektiert innerhalb der Septen wesentlich mehr Schnittpunkte als in Abb. 2 b.

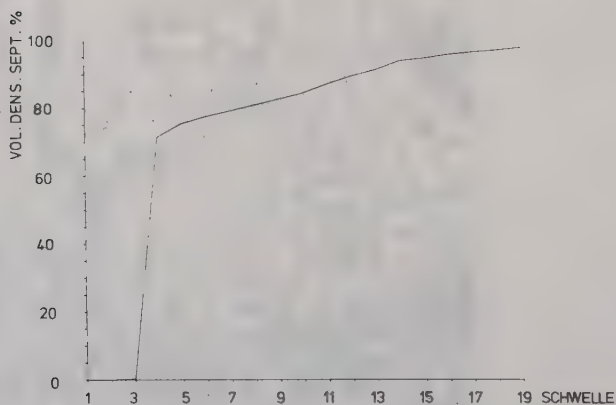


Abb. 4: Verlauf der Volumendichte (Vol. Dens.) bei systematischer Verstellung der Diskriminatorenswelle; plötzlicher Anstieg beim Durchgang von Schwelle 3 auf 4 auf ca. 70%; es folgt ein relativ gleichmäßiger, langsamer Anstieg auf 100%.

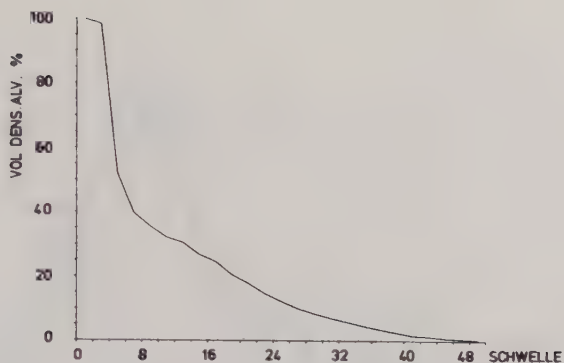


Abb. 5: Verlauf der Werte Volumendichte Septen bei systematischer Verstellung der Diskriminatorenswelle.

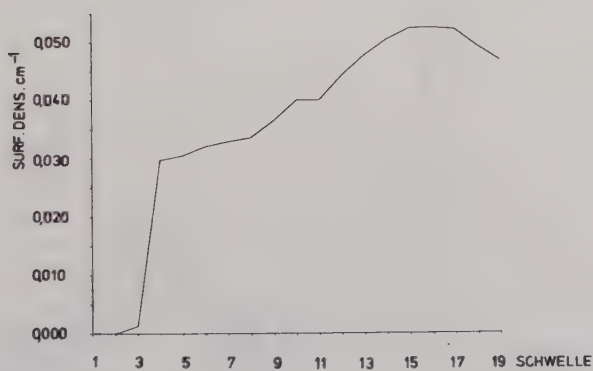


Abb. 6: Verlauf der Oberflächendichte (Surf.Dens.) bei Verstellung der Schwelle entsprechend der Abb. 4; Abfall der Werte gegen Ende der Meßreihe.

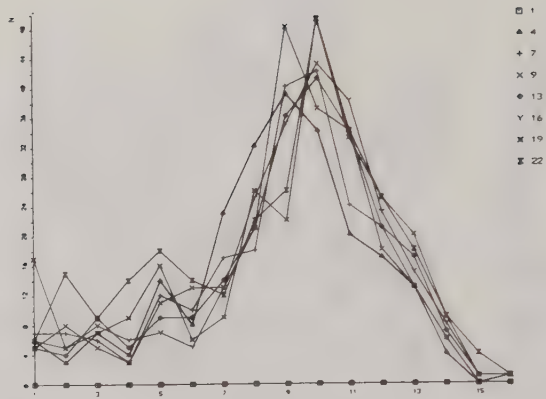


Abb. 7: Verschiedene Histogramme der Sehnenlängen über den Alveolen in Abhängigkeit von der Diskriminatoren-schwelle; es wurde nur jede dritte Messung geplottet. Vergr. 10 x.

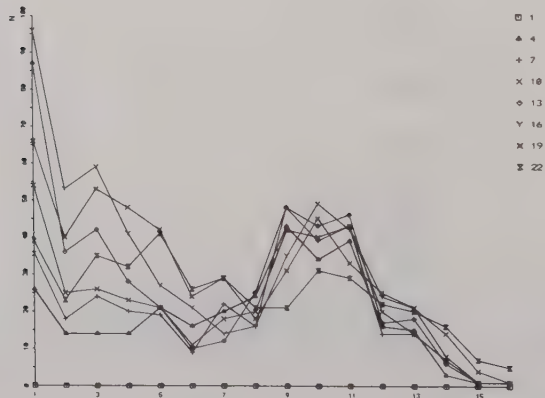


Abb. 8: Identisches Meßfeld wie in Abb. 7 bei 40facher Vergrößerung. Es findet sich wie in Abb. 7 ein Häufigkeitsmaximum über den Klassen 9 - 10. Zusätzlich treten bei Veränderung der Schwelle im Bereiche der kleinen Sehnenlängen (1 - 4) in Abhängigkeit von der Schwelle sehr variable Häufigkeiten auf.

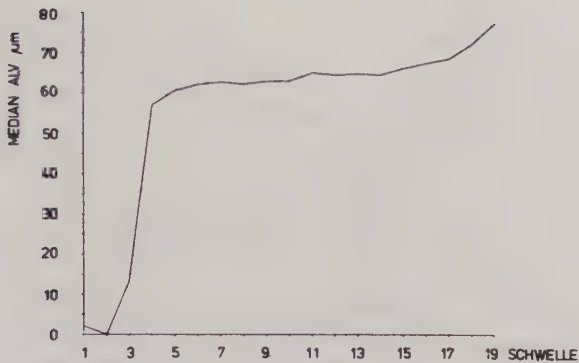


Abb. 9: Verhalten des Interdezilbereichs am Beispiel des Medians errechnet aus der Verteilung der Sehnenlängen in Abhängigkeit von der Schwelle entsprechend Abb. 7. Es zeigt sich über einen weiten Einstellbereich (etwa Schwelle 4 - 11) ein Plateau bei 60_{μm}.

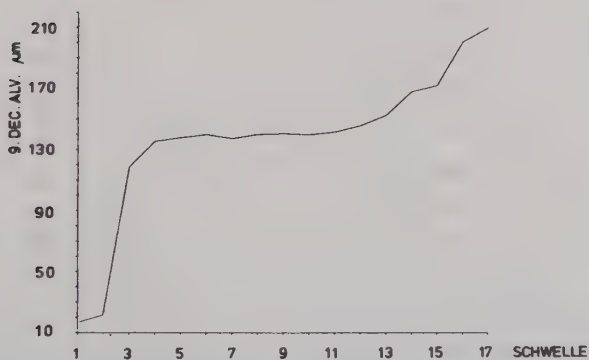


Abb. 10: Verlauf der 9. Dezile entsprechend Abb. 9.

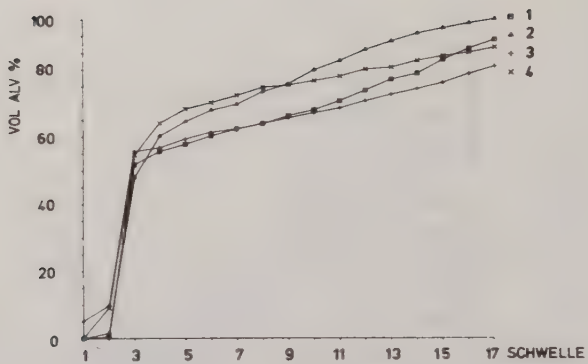


Abb.11: Volumenfraktion Alveolen bei 4 verschiedenen Präparaten in Abhängigkeit von der Schwelle.

Vergr. 10 x.

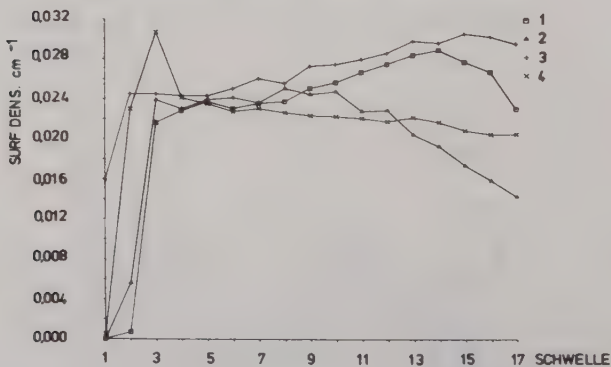


Abb.12: Die Oberflächendichten der Messungen aus Abb. 11. Die Werte im Bereich der Schwellen 1 - 3 verhalten sich sehr uneinheitlich; ein initialer Anstieg der Oberflächendichte wird sowohl beim Übergang von Schwelle 1 - 2 als auch bei 2 - 3 beobachtet.

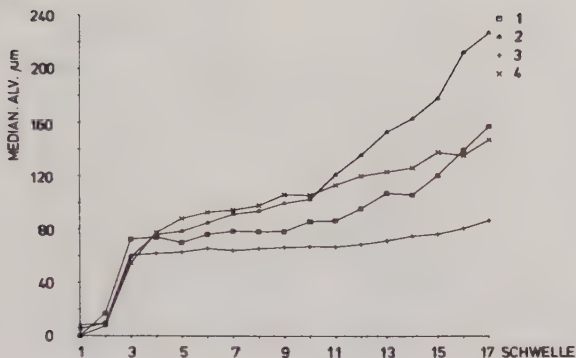


Abb.13: Median der Sehnenlängenverteilung der Alveolen in Abhängigkeit von der Schwelle der Messung aus Abb. 11. Es ergibt sich im Anfangsbereich ein der x-Achse relativ paralleler Verlauf der Kurven.

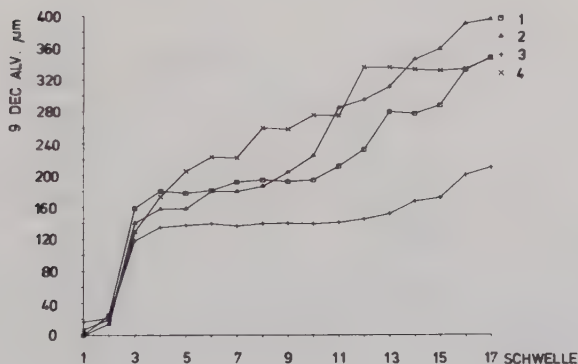


Abb. 14: 9. Dezile der Sehnenlängenverteilung der Alveolen; die Lage der Kurven weicht im Vergleich zu Abb. 13 weiter voneinander ab; der Verlauf ist aber wenig geradlinig.

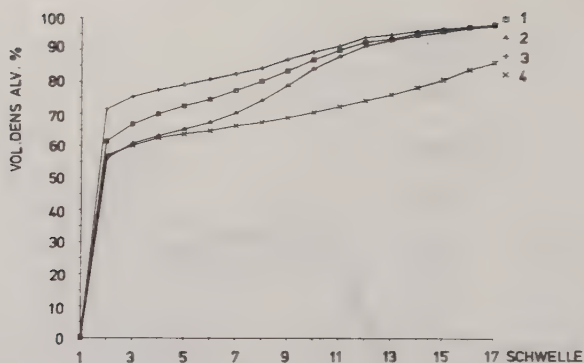


Abb. 15: Volumenfraktion Alveolen der Meßfelder aus Abb. 11 bei 4ofacher Vergrößerung. Es ergibt sich wieder eine unterschiedlich starke Steigung der Kurven.

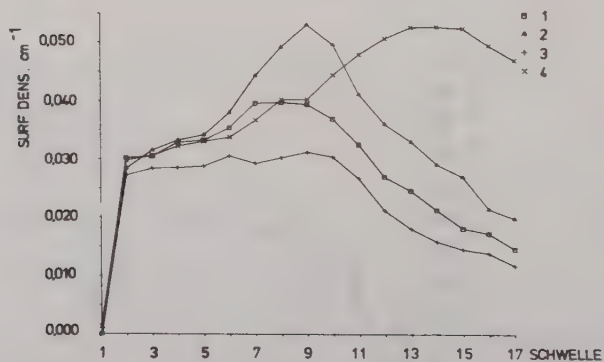


Abb. 16: Die Werte der Oberflächendichte der Messung aus Abb. 15

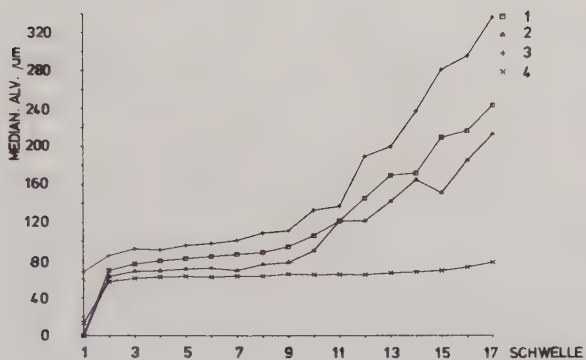


Abb. 17: Median der Sehnenlängenverteilung Alveolen aus Abb. 15; die vier verschiedenen Präparate werden über einen weiten Schwellwertbereich sauber getrennt.

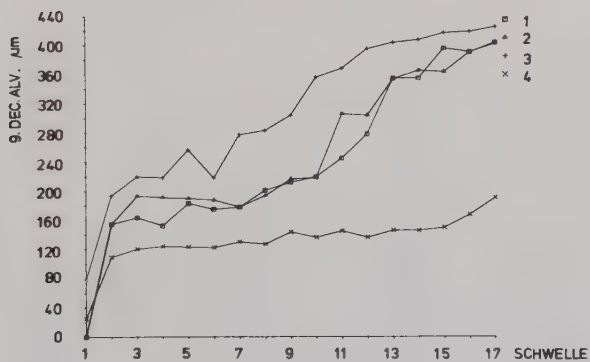


Abb. 18: 9. Dezile der Verteilung aus Abb. 17, große Lageunterschiede bei einem wenig geradlinigen Verlauf.

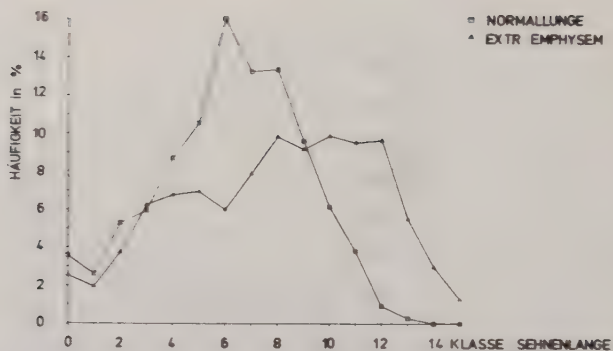


Abb. 19: Integriertes Histogramm der Sehnenlängen Alveolen einer Normallunge und einer Emphysemlunge. Es lagen jeweils 4 verschiedene Schnitte vor, die vollständig vermessen wurden. Die Emphysemlunge weist eine deutliche Rechtsverschiebung gegenüber der Kontrollung auf. Auf der x-Achse sind die Größenklassen in der log-Skalierung aufgetragen.

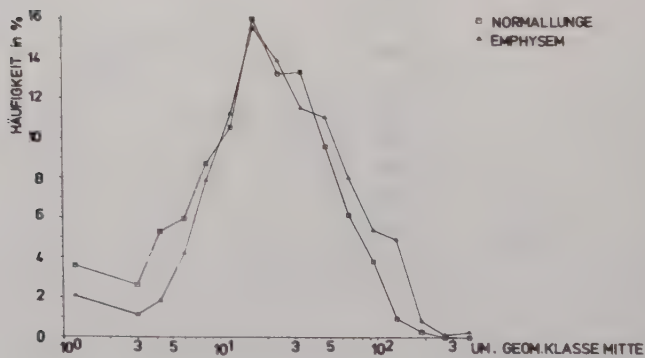


Abb. 20: Vergleich einer Normallunge mit einer Lunge, die ein angedeutetes Emphysem aufweist; Meßbedingungen und Auftragung entsprechend Abb. 19. Die Kurvenlagen sind nahezu identisch, lediglich auf der rechten Seite der Verteilung ergibt sich für die Emphysemlunge eine größere Häufigkeit der Sehnenlängen.

Lebenslauf

Am 22.4.1948 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. Ludwig Klinken und seiner Frau Marga in Wanne-Eickel geboren.

Von 1954 bis 1958 besuchte ich die Volksschule. Das Abitur bestand ich im Juli 1967 am Neusprachlichen Gymnasium in Wanne-Eickel.

Nach vier Semestern Studium der Naturwissenschaft in Münster und Marburg, arbeitete ich ab Herbst 1969 als Apothekenpraktikant in Bochum und legte im Herbst 1971 das pharmazeutische Vorexamen ab.

Zum Wintersemester 71/72 begann ich das Medizinstudium in Münster, wo ich im Frühjahr 1973 die ärztliche Vorprüfung ablegte. Das klinische Studium absolvierte ich an der Universität Düsseldorf und bestand die ärztliche Prüfung am 10. September 1976.

Vom 1. November 1976 bis 31. Oktober 1977 arbeitete ich am Lukaskrankenhaus in Neuss als Medizinalassistent und seit dem 15. November 1977 als Assistenzarzt in der chirurgischen Abteilung des Evangelischen Krankenhauses in Mettmann.

Düsseldorf 15. Dezember 1978

